

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.04.06

板芪口服液定性与定量方法的研究

董蓓蓓, 孙耀贵, 孙娜, 尹伟, 范阔海, 李宏全*

(山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801)

[收稿日期] 2018-11-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 04-0039-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了研究板芪口服液定性与定量的方法, 采用薄层色谱法(TLC)定性鉴别板芪口服液中的黄芪、丹参、黄芩与连翘; 高效液相色谱法(HPLC)测定板芪口服液中黄芩苷的含量。色谱柱: ZORBAX SB-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水-磷酸(47:53:0.2); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm。TLC 结果显示供试品色谱在与对照品、对照药材相应位置上显相同颜色斑点。HPLC 结果显示黄芩苷的含量在 0.1531~1.225 μg($r=0.999$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 低中高浓度的平均加样回收率分别为 96.99%、98.06%、98.96%, RSD 值分别为 2.02%、1.81%、1.29%。结果表明, 方法操作简单, 重复性、准确性好, 精密度高, 可作为板芪口服液的质量标准。

[关键词] 板芪口服液; HPLC; TLC; 质量标准; 含量

Study on Qualitative and Quantitative Methods of Banqi Oral Liquid

DONG Qian-qian, SUN Yao-gui, SUN Na, YIN Wei, FAN Kuo-hai, LI Hong-quan*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Corresponding author: LI Hong-quan, E-mail: livets@163.com

Abstract: To study the qualitative and quantitative methods of Banqi Oral Liquid. Thin layer chromatography (TLC) was performed to conduct qualitative identification of Astragali radix, Salvia miltiorrhiza, Scutellariae radix and Forsythia suspensa in Banqi Oral Liquid. The content of baicalin in Banqi Oral Liquid was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Column used was ZORBAX SB-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm, mobile phase used methanol-water-phosphoric acid (47:53:0.2), the flow rate was 1.0 mL/min the detection wavelength was 280 nm. The chromatogram of the test sample in the TLC showed the same color spot on the corresponding position of the reference substance and the reference drug. The HPLC result about the content of baicalin showed that the linear range is from 0.1531 to 1.225 μg ($r=0.999$), there is a good linear relationship with the peak area. The average recovery rates of low, medium and high concentrations were 96.99%, 98.06%,

基金项目: 国家重点研发计划项目(No.2017YFD0501500);“新型中兽药与兽用生物制品创新与示范”专项;山西省重点研发计划(No.201603D21109);山西省研究生教育创新项目(No.2018SY039)

作者简介: 董蓓蓓, 硕士, 从事中药调节动物免疫功能及其分子机制方向研究。

通讯作者: 李宏全。E-mail: livets@163.com

and 98.96%, RSD were 2.02%, 1.81%, and 1.29%. The method is simple to operate, have high accuracy and precision in repeatability, so can be used as the quality standard for the Banqi Oral Liquid.

Key words: Banqi Oral Liquid; HPLC; TLC; quality standard; content

板芪口服液是由黄芩、黄芪、丹参、连翘等药材提取的中药复方制剂,具有扶正祛邪,补气升阳,清热解毒,消肿散结的功效。临床上主要治疗猪病毒性心肌炎引起的发热、精神沉郁、减食或停食,蹄部皮肤开裂出血、蹄壳变形或脱落^[1-2]等问题。目前中药制剂作为药物或饲料添加剂治疗动物疾病具有毒副作用小、不易产生耐药性和绿色安全等优点^[3]。所以,建立完善的中药质量标准有利于形成自主创新的新兽药研究开发体系,更利于中兽药产业的迅速发展。为了有效控制中兽药质量标准,研究参考相关文献与实验室已有的质量控制方法,建立了定性鉴别黄芪、丹参、黄芩、连翘的薄层色谱方法与定量测定有效成分黄芩苷的 HPLC 法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1260 高效液相色谱仪(Agilent 公司);薄层色谱仪(CAMAG 公司);电子分析天平(赛多利斯公司);SB25-12D 超声清洗机(Scientz 公司)。

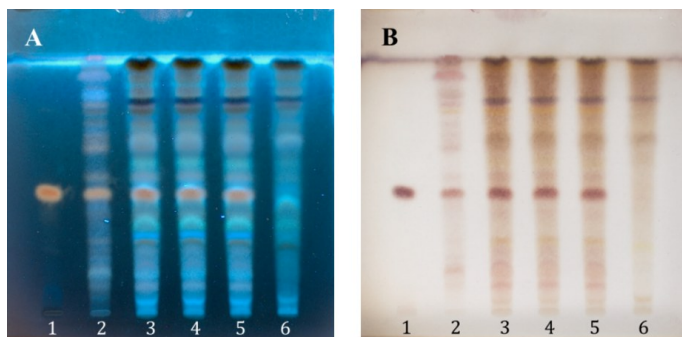
1.2 试药 黄芩苷对照品(批号 110715-201720)、黄芩素(批号 111595-200905)、黄芩对照药材(批号 120955-201309)、黄芪甲苷对照品(批号 110781-201515)、黄芪对照药材(批号 120974-201311)、连翘苷对照品(批号 110821-201615)、连翘对照药材(批号 120908-201216)、丹参酮ⅢA(批号 110766-200619)、丹参对照药材(批号 120923-201625)购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯(Merck 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。板芪口服液由黄芪、黄芩、丹参、连翘、板蓝根、蒲公英药材分二次煎煮,合并煎煮液滤过,浓缩至要求密度后醇沉滤过、回收乙醇,配液、灌装。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 黄芪 TLC 鉴别 取本品 10 mL,水饱和的正丁醇溶液振摇提取 2 次,每次 10 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤 2 次,每次 10 mL,再用正丁醇饱和的水溶液洗涤 2 次,每次 10 mL,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方比例,取除黄芪外的其他药材,同法制成阴性对照溶液。1 g 黄芪对照药材加甲醇 20 mL,超声 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 mL 溶解,同法制备作为黄芪对照药材溶液。对照品:1 mg/mL 黄芪甲苷溶液。吸取上述对照品、对照药材溶液各 5 μ L,供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μ L 点于同一 G 板上,以氯仿:甲醇:水(13:7:2)10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂,展开,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,分别置紫外灯(365 nm)和日光下检视。结果如图 1-A(365 nm)、1-B(日光),供试品在与对照品、对照药材色谱相应的位置上显相同的橙红色斑点(365 nm)、红色斑点(日光),缺黄芪阴性对照在相同斑点处未见干扰。

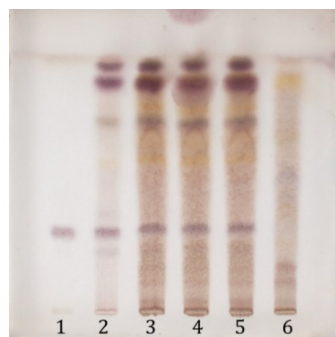
2.1.2 连翘 TLC 鉴别 取本品 10 mL 加氯仿提取两次,每次 10 mL,合并氯仿,蒸干,加 1 mL 甲醇溶解,作为供试品溶液。按处方比例,取除连翘外的其他药材,同法制成阴性对照溶液。1 g 连翘对照药材加水 50 mL,超声 30 min,过滤,滤液同法制备作为连翘对照药材溶液^[4]。对照品:0.25 mg/mL 连翘苷对照品溶液。吸取上述溶液各 10 μ L 点于同一 G 板上,以氯仿:甲醇(8:1)为展开剂,展开,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置于日光下检视。结果如图 2,供试品在与对照品、对照药材色谱相应的位置上显相同的褐色斑点,缺连翘阴性对照在相同斑点处未见干扰。



1: 对照品 (control); 2: 对照药材 (control medicinal material); 3-5: 三批板芪口服液样品 (Three batches of Banqi oral liquid samples); 6: 阴性对照 (negative control)

图 1 黄芪薄层色谱图方法验证

Fig 1 Verification of the method of TLC of Astragali radix

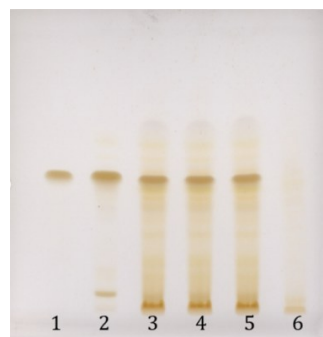


1: 对照品 (control); 2: 对照药材 (control medicinal material);

3-5: 三批板芪口服液样品 (Three batches of Banqi oral liquid samples); 6: 阴性对照 (negative control)

图 2 连翘薄层色谱图方法验证

Fig 2 Verification of the method of TLC of forsythia suspensa



1: 对照品 (control); 2: 对照药材 (control medicinal material);

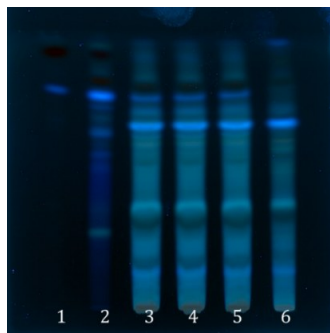
3-5: 三批板芪口服液样品 (Three batches of Banqi oral liquid samples); 6: 阴性对照 (negative control)

图 3 黄芩薄层色谱图方法验证

Fig 3 Verification of the method of TLC of Scutellariae radix

2.1.3 黄芩 TLC 鉴别 取本品 10 mL 加乙酸乙酯提取三次,每次 10 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,加 1 mL 甲醇溶解,作为供试品溶液。按处方比例,去除黄芩外的其他药材,同法制成阴性对照溶液。1 g 黄芩对照药材加乙酸乙酯: 甲醇 (3:1) 30 mL 超声 30 min,过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 5 mL 溶解作为黄芩对照药材溶液。对照品: 1 mg/mL 黄芩素对照品溶液。吸取上述对照品、对照药材溶液各 5 μ L,供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μ L 点于同一默克板上,以甲苯: 乙酸乙酯: 甲醇: 甲酸 (10:3:1:2) 为展开剂,预饱和 30 min,展开,晾干,置于日光下检视。如图 3 结果显示供试品在与对照品、对照药材色谱相应的位置上显相同的黄色斑点,缺黄芩阴性对照在相同斑点处未见干扰。

2.1.4 丹参 TLC 鉴别 取本品 10 mL 用水饱和的正丁醇溶液振摇提取 2 次,每次 10 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤 2 次,每次 10 mL,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方比例,去除丹参外的其他药材,同法制成阴性对照溶液。1 g 丹参对照药材加入 5 mL 乙醇,超声 15 min,离心 10 min,取上清作为对照药材溶液。对照品: 0.5 mg/mL 丹参酮 II A 对照品溶液。吸取上述对照品、对照药材溶液 5 μ L,供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μ L 点于同一默克板上,用氯仿: 甲苯: 乙酸乙酯: 甲醇: 甲酸 (6:4:8:1:4) 作为展开剂展开,晾干,在 365 nm 下检视。结果如图 4,供试品在与对照品、对照药材色谱相应的位置上显相同的蓝色斑点,缺丹参阴性对照在相同斑点处未见干扰。



1:对照品(control); 2:对照药材(control medicinal material);
3-5:三批板芪口服液样品(Three batches of Banqi oral liquid samples);
6:阴性对照(negative control)

图 4 丹参薄层色谱图方法验证

Fig 4 Verification of the method of TLC of *Salvia miltiorrhiza*

2.2 黄芩苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:甲醇:水:磷酸(47:53:0.2),流速:1 mL/min,检测波长:280 nm,柱温:25 ℃,进样量:10 μL,以黄芩苷计理

论塔板数不低于 2500。

2.2.2 样品溶液的制备 对照品制备:精密称定黄芩苷对照品 12.25 mg,加甲醇稀释制成 61.25 μg/mL 的对照品溶液。

供试品制备:精密量取板芪口服液 5 mL 于 100 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液 1 mL 加甲醇至 10 mL,即得。

阴性对照制备:除黄芩药材外其余按处方比例根据板芪口服液工艺制得的样品,按供试品制备方法制备,即得。

2.2.3 系统适应性实验 取上述溶液各 10 μL 进样,记录 HPLC 色谱图,如图 5,黄芩苷对照品出峰时间为 12.5 分左右,供试品溶液在相同时段目标峰与其他峰分离度均大于 1.5,基线平稳;缺黄芩的阴性溶液在 12.5 分左右基线平稳,无干扰峰出现,表明黄芩苷的测定方法适用于板芪口服液的含量测定。

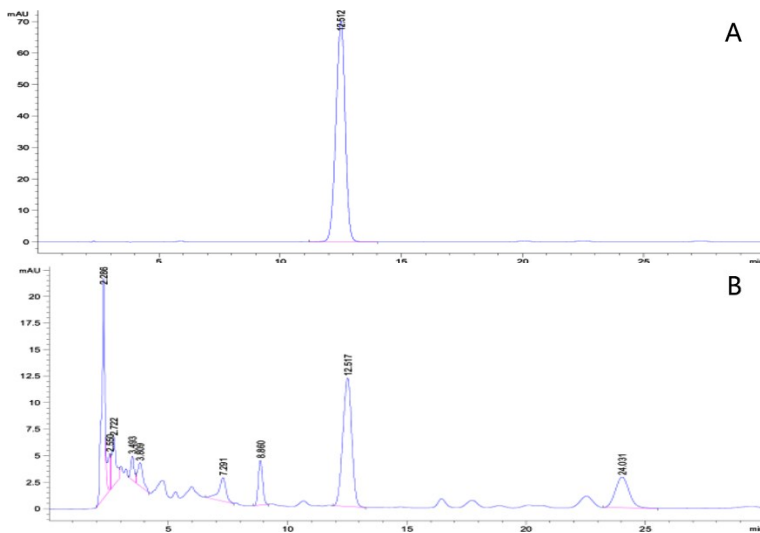


图 5 黄芩苷对照品(A)、样品(B)、阴性对照(C)HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC chromatogram of Baicalin control (A), sample (B) and negative control (C)

2.2.4 线性范围考察 取黄芩苷对照品溶液(382.8 μg/mL)加甲醇稀释至不同浓度进行进样,得回归方程 $y = 3021.3x - 31.634$, $R^2 = 0.9999$,结果表明黄芩苷标准品的进样量在 0.1531 ~ 1.225 L 之

间线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 黄芩苷对照品溶液重复进样 6 次,记录峰面积,结果可得黄芩苷峰面积的 RSD 值为 0.12%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 制备 6 份供试品溶液进行进样,记录峰面积,结果样品中黄芩苷的含量为 2.736 mg/g, *RSD* 值为 1.88%,表明实验方法的重复性好。

2.2.7 稳定性实验 取一份供试品溶液,在 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录峰面积,结果 6 次测定的 *RSD* 值为 0.86%,表明样品在 24 h 内有良好的稳定性。

2.2.8 加样回收率 精密称取已知含量 1.370 mg/mL 的样品 18 份,每份 1 mL 置于 25 mL 容量瓶中,精密加入低中高浓度(分别为 0.451、0.975、1.421 mg/mL)的黄芩苷对照品溶液 1 mL,按板芪口服液供试品制备,进样 10 μ L,测定峰面积,计算加样回收率。结果得加样回收率分别为 96.99%、98.06%、98.96%,*RSD* 值分别为 2.02%、1.81%、1.29%。

2.2.9 含量测定 取三批板芪口服液,按上述方法测得黄芩苷的平均含量为 2.71 mg/mL, *RSD* 值为 2.94%。

3 讨论与结论

通过对黄芪、连翘、黄芩和丹参的 TLC 鉴别作为板芪口服液的定性鉴别。其中黄芪的 TLC 鉴别方法参考了本实验室前期黄芪鉴别的方法,结果发现用正丁醇饱和水溶液洗涤后的条带更加清晰,杂质更少,所以选择此方法。连翘的 TLC 鉴别中,在 365 nm 下颜色较暗,不易观察。日光下斑点颜色明亮,易于观察。所以选择在日光下检视。

黄芩的 TLC 鉴别中,参照文献采用了不同提取溶剂包括水饱和正丁醇、氯仿、乙酸乙酯等,以及不同的展开条件进行试验。其中水饱和正丁醇作为提取溶剂效果最好。在使用 GF254 板与聚酰胺薄膜^[5],展开剂为甲苯:丙酮:冰醋酸:甲酸(8:1:1:1)^[6]的试验中,由于对应斑点不圆整未采用。参照《中国兽药典》^[7]中双黄连口服液的质量标准使用聚酰胺薄膜。两种展开剂分别为甲苯:乙酸乙酯:甲醇:甲酸(10:3:1:2)^[8]与乙酸^[9],结果显示斑点的分离度均不好,未采用。参照陆静娴等人的研究,使用青岛海洋 G 板,两种展开方法分别为氯仿:甲醇(9:1)晾干后喷以 2% 三氯化铁乙醇溶液^[10]和乙酸乙酯:丙酮:甲酸:

水(5:3:1:1)^[11],结果由于对照品的斑点不清晰未采用。最后使用默克板得到清晰完整的斑点,所以选择此方法。之前选择的对照品为黄芩苷,但由于在所有方法中黄芩苷的斑点的 *RF* 值小于 0.2,所以采用黄芩素作为对照品。

丹参的 TLC 鉴别中,采用不同方法处理样品,其中用水饱和的正丁醇溶液提取、氨试剂洗涤效果最好。在两种展开剂氯仿:甲苯:乙酸乙酯:甲醇:甲酸(6:4:8:1:4)与先用此展开剂展至 4 cm 再用石油醚(60-90):乙酸乙酯(4:1)展至 8 cm 下采用青岛海洋 G 板、GF254 板^[12],默克板进行展片,结果显示默克薄层板在前者展开剂的斑点最圆整且分离度好,所以采用此方法。另外还参照文献采用了聚酰胺薄膜,展开剂为丙酮:36%乙酸:氨水(10:25:1),晾干后用氨熏蒸 5 min^[13],此方法条带清晰,但斑点不清晰,所以没有采用。

板芪口服液的含量测定最初选择黄芪甲苷、连翘苷、丹酚酸 B 与黄芩苷为指标成分,但由于试验中还涉及了板芪口服液的工艺研究,前三种指标成分含量过低,误差大,而黄芩苷的含量高,更具有统计学意义,所以选择黄芩苷为含量测定的指标成分。黄芩苷的含量测定参照《中国兽药典》中黄芩药材的含量测定方法,样品与黄芩苷对照品对应的峰分离度好,基线平稳,可作为含量测定的定性方法。

板芪口服液的薄层色谱鉴定方法与高效液相色谱含量测定方法的研究为板芪口服液的质量标准奠定了基础,为后期新兽药的申报提供了数据支持。

参考文献:

- [1] 李绪更. 猪脑心肌炎的流行病学、症状、诊断和防治措施[J]. 现代畜牧科技, 2017(3):114-114.
Li X G. Epidemiology, symptoms, diagnosis and prevention of porcine encephalomyocarditis[J]. Technical Advisor for Animal Husbandry, 2017(3):114-114.
- [2] 王立斌, 蒙晓雷, 杨晓伟, 等. 猪病毒性脑心肌炎与蹄裂病混合感染的诊治[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(6):111-112.
Wang L B, Meng X L, Yang X W, et al. Diagnosis and treat-

- ment of mixed infection of swine viral encephalomyocarditis and lobes[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2014, 35(6): 111-112.
- [3] 乔美娟,晏永新,孙娜,等. 党参可溶性粉的薄层色谱鉴别[J]. *山西农业科学*, 2017, 45(5):732-735.
Qiao M J, Yan Y X, Sun N, *et al.* Identification of Water-soluble Dangshen Powder by TLC[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2017, 45(5):732-735.
- [4] 宋晓光,王少平,李秉润,等. 银翘消疹合剂质量标准[J]. *医药导报*, 2018(3):338-340.
Song X G, Wang S P, Li B R, *et al.* Quality Standard of Yin-qiao Xiaozhen Mixture[J]. *Herald of Medicine*, 2018(3):338-340.
- [5] 孙妍,马佳慧,王猛. 小儿清肺分散片的薄层鉴别研究[J]. *黑龙江中医药*, 2014, 43(3).
Sun y, Ma J H, Wang M. Thin layer identification of Xiaoer Qingfei Dispersible Tablets[J]. *Heilongjiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 43(3).
- [6] 赵增成,林树乾,李桂明,等. 白虎定喘口服液的质量检测[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(3):79-85.
Zhao Z C, Lin S Q, Li G M, *et al.* Quality Detection of Baihu Dingchuan Oral Liquid[J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2017, 38(3):79-85.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二部 2015 年版[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission, two People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia 2015 edition, volume II [S].
- [8] 许春燕. 银翘蓝芩口服液的质量标准及靶动物安全性研究[D]. 甘肃农业大学, 2016.
Xu C Y. Study on quality standard and targeted animal safety of Yinqiao Lanqin oral liquid[D]. Gansu Agricultural University, 2016.
- [9] 李龙,马善波,王锦,等. 金黄连口服液质量标准的提高[J]. *中国药师*, 2017, 20(10):1876-1878.
Li L, Ma S B, Wang J, *et al.* Improvement of the Quality Standard for Jinhuanglian Oral Liquid[J]. *China Pharmacist*, 2017, 20(10):1876-1878.
- [10] 陆静娴,谭春梅,陈碧莲,等. 明目上清丸质量标准改进[J]. *药物分析杂志*, 2016(11):2051-2058.
Lu J X, Tan C M, Chen B L, *et al.* Improvement of the quality control standard for Mingmu Shangqing pills[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016(11):2051-2058.
- [11] 刘俊丹,曾诗梅,雷金梅,等. 芩黄清肺散的质量标准研究[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(9):61-66.
Liu J D, Zeng S M, Lei J M, *et al.* Study on quality standard of Qinhuang Qingfei Powder[J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2017, 38(9):61-66.
- [12] 吴炜,张培影,陈永刚,等. 黄芪保心合剂质量标准[J]. *医药导报*, 2018(3):341-344.
Wu W, Zhang P Y, Chen Y G, *et al.* Quality Standard of Huangqi Baoxin Mixture[J]. *Herald of Medicine*, 2018(3):341-344.
- [13] 赵增成,林树乾,李桂明,等. 清营口服液质量检测方法的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(6):1647-1653.
Zhao Z C, Lin S Q, Li G M, *et al.* Study on quality detection method of Qingying Oral Liquid[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, 43(6):1647-1653.

(编辑:陈希)